

В.А. Кубишкін

Кримський державний
медичний університет
ім. С.І. Георгієвського,
Сімферополь

Зміни показників апоптозу у сироватці крові при променевої терапії злоякісних новоутворів

Blood serum apoptosis parameters changes
at radiation therapy for malignant tumors

Цель работы: Установить прогностическую ценность маркеров апоптоза (TNF- α , каспазы-8 и p53) для оценки эффективности лучевой терапии (ЛТ) злокачественных новообразований.

Материалы и методы: В исследование были включены больные со злокачественными опухолями различной локализации. У всех применяли ЛТ в соответствии с принятыми в клинике стандартами и протоколами, которые зависели от локализации и стадии опухоли. Дизайн исследования строился таким образом, что в окончательную группу для анализа вошел 31 пациент с опухолями: 7 — грудной железы, 12 — шейки матки, 5 — легких и 7 — головы и шеи, у которых в процессе ЛТ отмечалось уменьшение размеров опухоли более чем на 30 % и был проведен весь комплекс биохимических исследований. Контрольную группу составили 14 здоровых людей. Материалом исследования служила сыворотка крови больных с онкопатологией, полученная в начале и в конце курса ЛТ. В сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа определяли тумор-некротический фактор-альфа (TNF- α), каспазу-8 и протеин p53.

Результаты: Проведенные исследования показали, что наиболее динамичным из определяемых факторов в сыворотке крови является TNF- α . Его достоверное повышение отмечено во всех группах больных с опухолями различной локализации. Проведение курса ЛТ приводило к дальнейшему росту показателя в исследованных группах. При определении каспазы-8 и p53 в сыворотке крови больных с онкопатологией не удалось выявить существенных закономерностей. Каспаза-8 не определялась в 65 % исследованных образцов сыворотки крови онкобольных, а p53 — в 46 % образцов. У ряда больных с высокими уровнями p53 показатель практически не отличался в начале и конце курса ЛТ.

Выводы: Из изученных факторов апоптоза в сыворотке крови определение уровня TNF- α — наиболее чувствительный критерий для оценки эффектов формирования опухоли и оценки результатов ЛТ. Повышение уровня TNF- α после ЛТ позволяет предположить, что ее эффекты в большей степени связаны с активацией внешних путей апоптоза. В то же время использование определения каспазы-8 и p53 в сыворотке крови для оценки эффективности ЛТ малоинформативно в связи с плохой определяемостью показателей в крови и отсутствием выраженных откликов на ЛТ.

Ключевые слова: злокачественные опухоли, лучевая терапия, апоптоз, тумор-некротический фактор- α , каспаза-8, протеин p53.

Мета роботи: Визначити прогностичну цінність маркерів апоптозу (TNF- α , каспази-8 і p53) для оцінки ефективності променевої терапії (ПТ) злоякісних новоутворів.

Матеріали і методи: У дослідження було включено хворих зі злоякісними пухлинами різної локалізації. В усіх застосовували ПТ відповідно до прийнятих у клініці стандартів і протоколів, залежно від локалізації і стадії пухлини. Дизайн дослідження був таким чином, що в остаточну групу для аналізу увійшов 31 пацієнт із пухлинами: 7 — грудної залози, 12 — шийки матки, 5 — легень і 7 — голови та шиї, у яких у процесі ПТ було виявлено позитивну динаміку зі зменшенням розмірів пухлин більш як 30 % і було проведено весь комплекс біохімічних досліджень. Контрольну групу склали 14 здорових людей. Матеріалом дослідження служила сироватка крові хворих з онкопатологією, отримана на початку і в кінці курсу ПТ. У сироватці крові методом твердофазного імуноферментного аналізу визначали тумор-некротичний фактор-альфа (TNF- α), каспазу-8 і протеїн p53.

Результати: Проведені дослідження показали, що найбільш динамічним з визначуваних чинників у сироватці крові є TNF- α . Його вірогідне підвищення відмічено в усіх групах хворих із пухлинами різної локалізації. Проведення курсу ПТ приводило до

подальшого зростання показника в досліджених групах. При визначенні каспази-8 і p53 у сироватці крові хворих з онкопатологією не вдалося виявити істотних закономірностей. Каспаза-8 не визначалася в 65 % досліджених зразків сироватки крові онкохворих, а p53 — у 46 % зразків. У частини хворих із високими рівнями p53 показник практично не відрізнявся на початку й у кінці курсу ПТ.

Висновки: Із вивчених маркерів апоптозу в сироватці крові визначення рівня TNF- α — найчутливіший критерій для оцінки ефекту формування пухлини й оцінки результатів ПТ. Підвищення рівня TNF- α після ПТ дозволяє припустити, що її ефекти більшою мірою пов'язані з активацією зовнішніх шляхів апоптозу. Водночас використання визначення каспази-8 і p53 в сироватці крові для оцінки ефективності ПТ малоінформативне у зв'язку з недостатньою визначеністю показників у крові і відсутністю відповідей на ПТ.

Ключові слова: злоякісні пухлини, променева терапія, апоптоз, тумор-некротичний фактор- α , каспаза-8, протеїн p53.

Відомо, що апоптоз є активним механізмом клітинного саморегулювання, який підтримує в організмі певну кількість клітин і захищає його від накопичення аномальних клітинних варіантів. Апоптоз викликають як фізіологічні сигнали (зв'язування специфічних кілерних цитокінів зі своїми рецепторами), так і різні внутріклітинні ушкодження чи несприятливі умови, зокрема порушення структури ДНК, брак ростових чинників, гіпоксія тощо. Блокування апоптозу значно підвищує життєздатність патологічної, насамперед, неопластичної клітини, робить її менш чутливою до чинників протипухлинного імунітету й терапевтичних дій [1–3].

Зважаючи на інтенсивне накопичення даних про механізми апоптозу і його роль у розвитку онкологічної патології, в останні 10–15 років також з'явилися дані літератури, що свідчать про значну зміну погляду на природу й механізми радіаційної загибелі клітин. Показано, що радіочутливість пухлинних клітин може залежати від появи ушкоджень у генетичних структурах; порушень у сигнальних системах, які відповідають за процеси поділу й розмноження клітин; модуляції процесів, які інтегрують запуск або гальмування механізмів апоптозу. Запуск зазначених механізмів залежить від скоординованої активності групи генів, серед яких центральне місце посідає ген p53 [1, 4, 5]. Комплексне вивчення цих механізмів може привести до розробки принципово нових методів керування радіочутливістю й резистентністю злоякісних і нормальних тканин та до вдосконалення методів променевої і комбінованої терапії онкологічних хворих [6–8] з урахуванням оцінки стану біологічних і радіобіологічних маркерів [9].

У зв'язку з цим у проведеній роботі увага була сконцентрована на трьох ключових компонентах, які беруть участь у формуванні процесу апо-

птозу на різних етапах його розвитку. Альфа-фактор некрозу пухлин (TNF- α) є цитокіном, який виявляє цитотоксичність шляхом активації відповідних рецепторів на поверхні пухлинних клітин. Каспаза-8 є ферментом каспазного каскаду індукції апоптозу при його запуску через TNF- α або CD95. При цьому каспаза-8 багато в чому зв'язує внутрішній і зовнішній шляхи активації апоптозу; p53 — ген, який найчастіше мутує, безпосередньо пов'язаний з пухлинним ростом у людини; p53 протеїн регулює проліферацію і процеси старіння клітини й безпосередньо пов'язаний із регуляцією апоптозу.

Метою нашого дослідження було визначити прогностичну цінність маркерів апоптозу (TNF- α , каспази-8 і p53) для оцінки ефективності променевої терапії (ПТ) злоякісних новоутворів.

Методика дослідження

Під спостереженням перебував 31 хворий з онкопатологією, що проходив лікування у відділенні радіології Республіканської клінічної лікарні ім. Семашка й у відділенні ПТ Кримського Республіканського онкологічного диспансеру. Для характеристики хворих використовували класифікацію TNM. Поширеність пухлини і її точна локалізація були уточнені на основі обстеження, даних комп'ютерної томографії, звичайного рентгенологічного і рентгенотомографічного досліджень. Діагноз гістологічно верифіковано. Вік більшості хворих (76 %) становив 50–70 років.

Пацієнтів було розподілено на групи залежно від ураженого органа (із пухлинами: грудної залози — 7, шийки матки — 12, легенів — 5, голови і шиї — 7). Найбільше пацієнтів було з пухлинами T2–T3 голови і шиї та шийки матки. T1 був тільки у хворих із пухлиною матки, T4 — тільки з пухлиною грудної залози. Дизайн дослідження будувався таким чином, що в остаточну групу для аналізу ввійшли лише пацієнти, у яких у процесі ПТ було виявлено позитивну динаміку зі зменшенням розмірів пухлин більш як на 30 % [10] і проведено весь комплекс біохімічних досліджень. Контрольну групу склали 14 здорових людей, які за віковими та статевими ознаками відповідали групі хворих з пухлинами.

Променеву терапію застосовували згідно зі стандартними схемами й протоколами ПТ залежно від локалізації і стадії пухлини [11, 12].

У хворих з пухлиною в легенях лікування проводили в сумарній осередковій дозі 40–45 Гр з повторенням курсу через 10–14 днів, у пацієнтів із пухлиною шийки матки сумарна осередкова доза при поєднанні дистанційної та внутріпорожнинної ПТ при I стадії складала 30–38 Гр, II стадії — 40–50 Гр, III стадії — до 75 Гр. У жінок із пухлиною грудної залози СОД не перевищувала 60 Гр. У хворих із пухлинами голови і шиї лікування починали з проведення ПТ у сумарній осередковій дозі 30–40 Гр. За наявності регіонарних метастазів останні, незалежно від ступеня і поширеності первинної пухлини, включали в зону опромінювання. На цих дозах, після двотижневої перерви, здійснювали оцінку безпосередньої ефективності проведеної терапії. При повній регресії новоутвору або зменшенні його об'єму понад 50 %, пухлину розцінювали як радіочутливу і ПТ тривала до радикальної дози 50–70 Гр, залежно від застосованої методики опромінювання.

Матеріалом дослідження служила сироватка крові хворих на онкопатологію, отримана на початку і в кінці курсу ПТ. Кров для досліджень забирали з ліктьової вени. Сироватку крові отримували з нестабілізованої крові шляхом центрифугування протягом 15 хв при 1500 g на центрифугі ОПн-3 після попереднього охолодження до температури + 5–8 °С.

Компоненти апоптозу визначали імуноферментним методом з використанням твердофазних імуноферментних наборів, а TNF- α — з використанням набору виробництва «Вектор-Бест» (Росія), основним реагентом якого є моноклональні антитіла до фактора некрозу пухлини альфа. За даними виробника набору, середня концентрація TNF- α у сироватці крові людини складала 0,5 пг/мл з коливаннями 0–5,9 пг/мл. За нашими даними, у крові здорових осіб вона була в межах 0–0,86 пг/мл. Вміст каспази-8 визначали за допомогою імуноферментного набору Bender MedSystem (Австрія). За даними виробника, рівень каспази-8 у контролі в сироватці крові складав від 0 до 1,20 нг/мл. За нашими даними, каспаза-8 не визначалася в сироватці крові 83 % осіб контрольної групи, а значення показника були в межах 0,0–0,2 нг/мл. Концентрацію p53 визначали з використанням твердофазного імуноферментного набору фірми Bender MedSystems (Австрія). За даними виробника, у сироватці крові здорових осіб p53 зазвичай має бути відсутнім. За нашими даними, в осіб контрольної групи p53 не виявлявся в сироватці крові 67 % зразків, у решті його значення були 0,00–3,45 од/мл.

Статистичну обробку отриманих даних проведено з використанням методів варіаційної статистики з обчисленням середніх величин (M) і стандартної квадратичної похибки середнього значення (m). Для оцінки вірогідності спостережуваних змін використовували t-критерій Стьюдента. За вірогідну приймали різницю середніх значень при $p < 0,05$. Для оцінки ефекту дії ПТ застосовували непараметричні методи, що включають критерій знаків і парний критерій Вілкоксона ($p < 0,05$) [13]. Статистичні розрахунки виконували за допомогою програмного забезпечення Microsoft Office Excel.

Результати та їх обговорення

Визначення показників апоптозу показало, що найбільш динамічним при пухлинах є фактор некрозу пухлини-альфа (таблиця). Встановлено, що концентрація TNF- α була підвищеною в сироватці крові хворих зі злоякісними пухлинами всіх вивчених локалізацій відносно значень у здорових осіб. Найбільш вираженим було підвищення у хворих із пухлинами

шийки матки й легенів, у яких TNF- α збільшувався в середньому в 15–16 разів ($p < 0,01$). Мінімальне підвищення відмічено в групі з пухлинами грудної залози, але й у цих хворих TNF- α підвищувався більше, ніж у 10 разів ($p < 0,05$).

При визначенні каспази-8 і p53 у сироватці крові хворих з онкопатологією не вдалося виявити істотних закономірностей. Каспаза-8 не визначалася в 65 % досліджених зразків сироватки крові онкохворих, а p53 — у 46 %. При цьому, каспаза-8 не визначалася в сироватці крові трьох груп пацієнтів із пухлинами грудної залози, шийки матки й ділянки голови та шиї. Рівень p53 у хворих на злоякісні новоутвори практично не відрізнявся від такого в контролі.

У процесі лікування з використанням ПТ спостерігалася тенденція до ще більш значного підвищення рівня TNF- α . Його середні значення зросли в усіх групах хворих, але через великий розкид показника не виявлено вірогідних відмінностей між концентраціями TNF- α до і після ПТ з використанням критерію Стьюдента. У той же час у групах хворих із пухлинами грудної залози, легенів і ділянки голови та шиї вміст TNF- α в сироватці крові після ПТ почав відрізнятися від контролю з більшим ступенем вірогідності ($p < 0,001$). Крім того, у групі з пухлинами легенів зростання TNF- α після ПТ підтверджене вірогідною відмінністю з використанням критерію знаків.

Два інших показники апоптозу під час ПТ не виявили істотної динаміки. Слід зазначити, що каспаза-8 почала частіше визначатися в крові пацієнтів після радіаційної дії. Якщо до лікування вона не визначалася у 83,3 % пацієнтів, то після ПТ з'явилася в сироватці крові 50 % обстежених.

Істотних зрушень при ПТ не виявлено і при дослідженні чинника p53. До радіаційної дії його не визначали в 36,1 % обстежених, а після ПТ — у 41,6 % хворих. Водночас у кількох хворих показники рівня p53 в сироватці крові були дуже високими. Ми провели аналіз результатів цих хворих і реакції показника на ПТ. Хворий А., діагноз: рак нижньої губи, T2N1M0, на гістологічному дослідженні — плоскоклітинний рак, показник p53 до ПТ — 99,18, після

ПТ — 98,61 од/мл. Хворий Д., діагноз: рак гортаноглотки, T2N1M0, на гістологічному дослідженні — плоскоклітинний нероговіючий рак, показник p53 до ПТ — 58,5, після — 57,9 од/мл. Хвора Ш., діагноз — рак правої грудної залози, T4N1M0, на гістологічному дослідженні — залозистий рак. Показник p53 до ПТ — 11,40, після — 9,03 од/мл. Як видно з представлених даних, якщо рівень p53 був високим до ПТ, то й після неї зберігався на цьому ж рівні. Істотної динаміки змін величин показника при радіаційній дії не відзначалося. Це дозволило дійти висновку, що високі значення рівня p53 у сироватці крові деяких хворих пов'язані з особливостями патогенезу формування пухлин, проте всебічний аналіз наявних клінічних результатів не дозволив вирішити, який чинник може впливати на появу високих рівнів p53 у крові.

В основу проведеної роботи було покладено припущення, що в разі ефективності ПТ і реалізації ефектів дії опромінення через активацію вивчених чинників апоптозу збільшення їх концентрації може бути виявлене в сироватці крові. Проте нам не вдалося визначити зміни у рівні каспази-8 і p53 в сироватці крові хворих із пухлинами і при проведенні ПТ.

Найдинамічнішим з трьох вивчених показників у проведеному дослідженні виявився TNF- α .

Цей фактор некрозу пухлини є одним із прозапальних цитокинів і його роль у формуванні запальних процесів пов'язана з участю в ушкодженні тканин [14]. Разом з тим, роль TNF- α у

процесі канцерогенезу є більш спірною, оскільки він може вибірково викликати апоптоз пухлинних клітин ендотелію через каскад каспаз [1], але також може сприяти зростанню пухлини й метастазів, імовірно, через активацію ядерного чинника NF- κ B [15]. Крім того, деякі дослідження показали роль TNF- α у прогресії й інвазії пухлини шляхом активації системи матриксних металопротеїназ [16, 17].

У зв'язку з цим посилення синтезу й підвищення рівня TNF- α при пухлинних процесах і їх лікуванні розглядається з різних поглядів. Зокрема робляться спроби до використання TNF- α як лікарської речовини при внутріпухлинному введенні [18] і застосування його інгібіторів з метою протипухлинної терапії [15]. У нечисленних працях з вивчення реакції TNF- α при дії радіації показано, що ПТ може призводити до дозозалежного посилення синтезу TNF- α при збільшенні дози від 10 до 20 Гр з істотним збільшенням кількості апоптотичних клітин у тканинах пухлини [19]. Крім того показано, що ступінь активації TNF- α у процесі протипухлинної терапії корелював з якістю і тривалістю життя пацієнтів зі злоякісними новоутворами [20].

Отримані у проведеній роботі результати зі збільшенням рівня TNF- α у процесі ПТ також можна трактувати з погляду його участі в реакціях апоптозу. Зокрема, у наших дослідженнях [21] із вивчення реакцій компонентів неспецифічного протеолізу показано, що при ефективності ПТ існує тенденція до нормалізації цих показників, тобто показники протеолізу і

*Зміни показників апоптозу в сироватці крові хворих із пухлинами у процесі променевої терапії (M \pm m)
Changes of blood serum apoptosis parameters in patients with tumors during radiation therapy (M \pm m)*

Група хворих	Показник					
	TNF- α , пг/мл		каспаза-8, нг/мл		p53, од/мл	
	До променевої терапії	Після променевої терапії	До променевої терапії	Після променевої терапії	До променевої терапії	Після променевої терапії
Контроль, n = 14	0,21 \pm 0,16		0,048 \pm 0,039		1,20 \pm 0,63	
Пухлина: грудної залози, n = 7	*2,17 \pm 0,71	*4,18 \pm 0,98	0	0,054 \pm 0,042	2,35 \pm 0,53	1,62 \pm 0,32
Шийки матки, n = 12		*20,17 \pm 8,22	0	0,006 \pm 0,004	0,46 \pm 0,15	0,27 \pm 0,16
Легенів, n = 5	*3,21 \pm 0,63	*, **4,23 \pm 0,47	0,066 \pm 0,039	0,204 \pm 0,103	0,34 \pm 0,16	0,04 \pm 0,04
Голови і шиї, n = 7	*3,21 \pm 0,74	*3,91 \pm 0,91	0	0	0,50 \pm 0,27	0,48 \pm 0,28

Примітка. Зірочками позначено вірогідність відмінностей: * — (p < 0,05) — відносно контролю (критерій Стьюдента); ** — відмінності вірогідні (p < 0,05) між значеннями до і після ПТ (критерій знаків).

TNF- α реагують різноспрямовано. Дані літератури й отримані в нашому дослідженні результати дозволяють зробити припущення, що в підвищенні TNF- α у сироватці крові при ПТ існує специфічна складова, яка може виявлятися участю цього чинника в реалізації реакцій апоптозу, а ефекти ПТ більшою мірою пов'язані з активацією зовнішніх шляхів апоптозу.

ВИСНОВКИ

1. Визначення каспази-8 і p53 у сироватці крові хворих на злоякісні пухлини для оцінки ефективності ПТ малоінформативне у зв'язку з низьким вмістом цих речовин у крові й відсутністю змін при проведенні ПТ.

2. У хворих на злоякісні пухлини рівень TNF- α у крові в 10–15 разів перевищує такий у пацієнтів контрольної групи. Після курсу ПТ вміст TNF- α зростає ще значніше, особливо у хворих із новоутворами легень, що вказує на можливість реалізації ефектів ПТ за участю зовнішнього шляху активації апоптозу і надає цьому показнику статусу потенціального предикативного маркера в умовах променевого лікування.

Література

1. Фільченков О.О., Стойка Р.С. Апоптоз і рак: від теорії до практики. – Тернопіль: ТДМУ, 2006. – 524 с.
2. Hengartner M.O. // *Nature*. – 2000. – Vol. 407. – P. 770–776.
3. Kaufmann S.H., Hengartner M.O. // *Trends Cell Biol.* – 2001. – Vol. 11. – P. 526–534.
4. Meun R.E., Milas L., Ang K.K. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2009. – Vol. 85, № 2. – P. 107–115.
5. Dumont F., Altmeyer A., Bischoff P. // *Expert Opin. Ther. Pat.* – 2009. – Vol. 19, № 6. – P. 775–799.
6. Ильин Н.В. // *Практ. онкол.* – 2004. – Т. 5, № 3. – С. 209–215.
7. Комарова Е.А., Гудков А.В. // *Биохимия.* – 2000. – Т. 65, № 1. – С. 48–56.
8. Irene M., Thomas E., Alex A. // *Cancer J. Clin.* – 2005. – Vol. 55. – P. 178–194.
9. Choi N. et al. // *Lung Cancer.* – 2001. – Vol. 31, № 1. – P. 43–56.
10. Eisenhauer E.A. et al. // *Europ. Journ. of Canc.* – 2009. – Vol. 45. – P. 228–247.
11. Протоколи надання медичної допомоги хворим на злоякісні новоутворення / Пилипенко М.І. та ін. – Харків, 2005. – 118 с.
12. Клінічні протоколи спеціалізованої допомоги хворим на злоякісні новоутворення. – Київ, 2006. – 123 с.
13. Юнкеров В.И., Григорьев С.Г. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. – СПб: ВМедА, 2002. – 266 с.
14. Balkwill F., Mantovani A. // *Lancet.* – 2001. – Vol. 357. – P. 539–545.
15. Zidi I., Mestiri S., Bartegi A., Amor N.B. // *Med. Oncol.* – 2009. – 14 p.
16. Hagemann T., Robinson S.C., Schulz M. et al. // *Carcinogenesis.* – 2004. – Vol. 25. – P. 1543–1549.
17. Redondo-Mucos J., Escobar-Diaz E., Samaniego R. et al. // *Blood.* – 2006. – Vol. 108. – P. 3143–3151.
18. Remco van Horsen, Timo L. M. ten Hagen, Alexander M. M. // *The Oncolog.* – 2006. – Vol. 11. – P. 397–408.
19. Ito A., Shinkai M., Hakamada K. et al. // *J. of Bioscience and Bioengineer.* – 2001. – Vol. 92. – P. 598–601.
20. Marucha I P., Crespín T., Shelby R., Andersend B. // *Brain Behav. Immun.* – 2005. – Vol. 19. – P. 521–525.
21. Кубышкин В.А. Факторы апоптоза и протеолиза как маркеры эффективности лучевой терапии злокачественных новообразований // *Актуальные проблемы госпитальной медицины.* – Севастополь, 2009. – С. 71–72.

Надходження до редакції 05.01.2010.

Прийнято 14.05.2010.

Адреса для листування:

Кубышкин Володимир Анатолійович,
вул. Менделєєва, 12, кв. 46, Сімферополь, 95034, Україна